



ÖSTERREICHISCHES
PATENTAMT

52 Klasse: 30 I 001/02
51 Int.Cl.³: A61L 015/01

A61L 015/06

17 77 2
AN

19

AT PATENTSCHRIFT

11 Nr. 359 653

73 Patentinhaber: IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT FÜR CHEMISCH
-MEDIZINISCHE PRODUKTE
WIEN ÖSTERREICH

54 Gegenstand: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINES GEWEBEKLEB-
STOFFES

61 Zusatz zu Patent Nr.

62 Ausscheidung aus:

22 21 Angemeldet am: 1979 02 15, 1190/79

23 Ausstellungspriorität:

33 32 31 Unionspriorität:

42 Beginn der Patentdauer: 1980 04 15

Längste mögliche Dauer:

45 Ausgegeben am: 1980 11 25

72 Erfinder:

WIEN

SCHWARZ OTTO DR.

ÖSTERREICH

WIEN

LINNAU YENDRA DR.

ÖSTERREICH

WIEN

LÖBLICH FRANZ ING.

ÖSTERREICH

WIEN

SEELICH THOMAS DR.

ÖSTERREICH

Braun

Hofle

Späthler

Lindner

Mahar

60 Abhängigkeit:

56 Druckschriften, die zur Abgrenzung vom Stand der Technik in Betracht gezogen wurden:

AT 359 653

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Gewebeklebstoffes auf Basis von menschlichen oder tierischen Proteinen, mit einem Gehalt an Fibrinogen und Faktor XIII.

Es ist seit langem bekannt, Blutgerinnungssubstanzen zur Stillung von Blutungen bzw. für Wundversiegelungen heranzuziehen. Nach den ersten derartigen Vorschlägen wurden Fibrintampons bzw. 5 Fibrinplättchen verwendet. Während des Zweiten Weltkrieges wurden Gewebeklebstoffe mit Hilfe von Blutplasma vorgeschlagen.

In letzter Zeit wurde von H. Matras u.a. in der "Wiener Medizinischen Wochenschrift", 1972, Seite 517, ein Gewebeklebstoff auf Basis von Fibrinogen und Faktor XIII zur nahtlosen interfazikulären Nerven-Transplantation im Tierexperiment beschrieben.

10 Eine weitere Studie stammt von Spängler u.a. in der "Wiener Klinischen Wochenschrift", 1973, Seiten 1 bis 7. Auch hier wurde in Tierversuchen die Möglichkeit aufgezeigt, mit Hilfe von Fibrinogen als Kryopräzipitat und Thrombin eine Gewebeklebung vorzunehmen.

Die bekannten Präparate haben sich noch nicht als zufriedenstellend erwiesen, weil sie die an einen Gewebeklebstoff zu stellenden Forderungen, welche die folgenden sind:

- 15 a) hohe Belastbarkeit der Klebungen bzw. Wundversiegelungen sowie sichere und anhaltende Blutstillung, d.h. gute Haftfähigkeit des Klebers an den Wund- bzw. Gewebsflächen, sowie hohe innere Festigkeit desselben,
- b) regelbare Haltbarkeit der Klebungen im Körper,
- c) vollkommene Resorbierbarkeit des Klebstoffes im Verlauf des Wundheilungsprozesses,
- 20 d) wundheilungsfördernde Eigenschaften,

noch nicht in ausreichendem Maße erfüllen. Dies mag teilweise darauf zurückzuführen sein, daß die für die Blutstillung notwendigen Gerinnungsfaktoren in den bekannten Präparaten nicht in einem optimalen Verhältnis zueinander vorhanden waren und auch daran, daß die fibrinolytische Aktivität im Kleberebereich nur ungenügend beherrscht wurde. Es kam häufig durch enzymatische Einwirkung zu einer vorzeitigen 25 Auflösung der Gewebeklebstoffe.

Die Erfindung bezweckt die Vermeidung dieser Nachteile und Schwierigkeiten und stellt sich die Aufgabe, einen Gewebeklebstoff auf Basis von menschlichen oder tierischen Proteinen, welcher Fibrinogen und Faktor XIII enthält, zu schaffen, der die weiter oben angeführten Voraussetzungen erfüllt.

Die Erfindung beruht auf der Erkenntnis, daß es erforderlich ist, ein bestimmtes Verhältnis von 30 Fibrinogen zu Faktor XIII einzuhalten und daß durch eine bestimmte Menge eines Inhibitors die fibrinolytische Aktivität gehemmt wird.

Die gestellte Aufgabe wird bei einem Verfahren der eingangs erwähnten Art erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß in einer fibrinogenhaltigen Blutplasmafraktion ein Konzentrationsverhältnis von Faktor XIII zu Fibrinogen, ausgedrückt in Einheiten des Faktors XIII pro Gramm Fibrinogen, von 35 mindestens 80 eingestellt und der Blutplasmafraktion ein Plasminogen-Aktivator-Inhibitor oder Plasmin-Inhibitor, vorzugsweise Aprotinin, in einer Menge von 20 bis 2000 Kallikrein-Inaktivator-Einheiten (KIE) pro ml sowie gegebenenfalls kälteunlösliches Globulin und/oder Albumin zugefügt werden.

Vorteilhaft wird aus einem fibrinogenhaltigen Plasma-Kryopräzipitat durch ein- oder mehrfache Behandlung mit einer Pufferlösung, welche Natriumzitrat, Natriumchlorid, einen Plasminogen-Aktivator-In- 40 hibitor oder Plasmin-Inhibitor sowie gegebenenfalls Glycin und Glucose enthält, kälteunlösliches Plasmaprotein entfernt, der gereinigte Niederschlag gelöst und gegebenenfalls der gelöste, gereinigte Niederschlag durch Tiefrieren haltbar gemacht.

Bevorzugt wird das Kryopräzipitat aus humanem oder tierischem Frischplasma hergestellt, welches bei -20°C eingefroren wurde. Bei Erhöhung der Temperatur auf 0 bis 2°C wird das Kryopräzipitat 45 gewonnen und durch Zentrifugieren abgetrennt. Die Pufferlösung, mit der das Kryopräzipitat behandelt wird, weist zweckmäßig einen p_H -Wert von 6,0 bis 8,0 auf. Das kälteunlösliche Plasmaprotein wird durch Zentrifugieren unter Einhaltung einer Temperatur von 0 bis 4°C abgetrennt. Der gereinigte Niederschlag wird sodann mit der Pufferlösung so lange gewaschen, bis die gewünschten Verhältnisse von Faktor XIII zu Fibrinogen bzw. das angestrebte Verhältnis des Fibrinogens, des kälteunlöslichen Globulins und des 50 Albumins erreicht sind.

Bei einem erfindungsgemäß hergestellten Gewebeklebstoff beträgt somit das Verhältnis des Faktors XIII zu Fibrinogen, ausgedrückt in Einheiten des Faktors XIII pro Gramm Fibrinogen, mindestens 80, und es ist darin ein Plasminogen-Aktivator-Inhibitor oder Plasmin-Inhibitor, vorzugsweise Aprotinin, in einer Menge von 20 bis 2000 KIE/ml enthalten.

Nach einer bevorzugten Ausführungsform enthält der erfindungsgemäß erhältliche Gewebeklebstoff kälteunlösliches Globulin, welches, wie festgestellt werden konnte, die Wirksamkeit fördert.

Nach einem weiteren Merkmal der Erfindung enthält der erfindungsgemäß hergestellte Gewebeklebstoff zusätzlich Albumin, welches eine stabilisierende Wirkung auf die Komponenten des Gewebeklebstoffes ausübt.

Nach einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform sind das Fibrinogen, das kälteunlösliche Globulin und das Albumin in einem Verhältnis von 60 bis 98 : 0,5 bis 20 : 0 bis 15 zueinander enthalten und ist Faktor XIII in einer Menge von mindestens 7 Einheiten/ml enthalten.

Um die gewünschte Wirkung sicherzustellen, soll das Fibrinogen in einer Menge von mindestens 10 70 mg/ml enthalten sein.

Der erfindungsgemäß erhältliche Gewebeklebstoff besitzt charakteristische Vernetzbarkeitseigenschaften, welche nach der Natriumlaurylsulfat-(SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Methode bestimmbar sind. Der Test wird derart durchgeführt, daß nach dem Vermischen des Gewebeklebstoffes mit dem gleichen Volumen einer Lösung, enthaltend 40 μ Mol CaCl_2 und 15 NIH-Einheiten (US National Institute of Health-Einheiten) Thrombin/ml, die Mischung bei 37°C inkubiert wird. Der Vernetzungsgrad wird nach 15 Stoppen der Reaktion und reduktiver Spaltung der in den Proteinen enthaltenen Disulfidbrücken durch Zugabe eines Gemisches von Harnstoff, Natriumdodecylsulfat und β -Mercaptoäthanol durch Gelelektrophorese bestimmt. Charakteristisch für den erfindungsgemäßen Gewebeklebstoff ist eine vollständige Vernetzung der Fibrin- γ -Ketten nach 3 bis 5 min und eine mindestens 35%ige Vernetzung der Fibrin- α -Ketten nach 2 h.

Der erfindungsgemäß erhältliche Gewebeklebstoff weist eine universelle Anwendbarkeit auf. Er kann zum nahtlosen Verbinden von menschlichen oder tierischen Gewebe- oder Organteilen, zur Wundversiegelung und Blutstillung sowie zur Förderung von Wundheilungen verwendet werden.

Bevorzugte Anwendungsgebiete, auf welchen der erfindungsgemäß herstellbare Gewebeklebstoff 25 erfolgreich eingesetzt werden kann, sind: Indikationen im Bereich der Hals-, Nasen-, Ohren- und Kieferchirurgie, Zahnheilkunde, Neurochirurgie, plastischen Chirurgie, allgemeinen Chirurgie, Abdominalchirurgie, Thorax- und Gefäßchirurgie, Orthopädie, Unfallchirurgie, Urologie, Ophthalmologie und Gynäkologie.

Vorteilhaft wird vor der Applikation des erfindungsgemäß erhältlichen Gewebeklebstoffes auf das zu 30 verbindende Gewebe eine Mischung von Thrombin und Calciumchlorid dem Klebstoff zugefügt oder auf das Gewebe aufgebracht.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird durch das folgende Beispiel 1 näher erläutert:

178,5 l humanes, bei -20°C tiefgefrorenes Frischplasma wurden auf +2°C erwärmt. Das erhaltene Krypopräzipitat wurde durch Zentrifugieren abgetrennt und bei +2°C mit 8 l einer Pufferlösung, enthaltend 35 6,6 g $\text{Na}_3\text{-Citrat}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3,4 g NaCl, 10,0 g Glycin, 13,0 g $\text{Glucose}\cdot\text{H}_2\text{O}$ und 50000 KIE Aprotinin pro Liter, und einem pH -Wert von 6,5 behandelt und nochmals bei +2°C zentrifugiert. Die Behandlung mit der erwähnten Pufferlösung und das anschließende Zentrifugieren wurden einmal wiederholt. Der abgetrennte Niederschlag wurde durch Erwärmen auf 37°C verflüssigt.

In dem so erhaltenden Produkt war Aprotinin in einer Konzentration von 50 KIE/ml vorhanden. Das 40 Verhältnis Fibrinogen zu kälteunlöslichem Globulin zu Albumin wurde in dem Produkt mit 86,2 : 6,7 : :2,2 bestimmt. Diese Bestimmung wurde ebenfalls nach der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Methode, u.zw. a) mit einer nicht reduzierten und b) mit einer mit β -Mercaptoäthanol reduzierten Probe des Gewebeklebers durchgeführt. An Faktor XIII wurden 13,8 Einheiten/ml gefunden bzw. betrug das Verhältnis des Faktors XIII zu Fibrinogen, ausgedrückt in Einheiten des Faktors XIII pro Gramm Fibrinogen, 45 152. Fibrinogen war in einer Menge von 90,6 mg/ml enthalten.

Die Bestimmungen erfolgten in folgender Weise: Die Bestimmung der Faktor XIII-Einheiten erfolgte mittels eines Vernetzungstests, bei dem Faktor XIII-freies Fibrinogen als Substrat verwendet und die durch die Zugabe der unbekannten verdünnten Probe bewirkte Fibrinvernetzung als Maß für die darin enthaltene Menge an Faktor XIII diente. Eine entsprechende Eichkurve wurde mit gepooltem humanem 50 Citratplasma erhalten, wobei per definitionem 1 ml Plasma 1 Einheit Faktor XIII enthält. Die Proteinbestimmungen erfolgten mittels der Methode nach Kjeldahl.

Der Vernetzungstest nach der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Methode ergab eine vollständige Fibrin- γ -Vernetzung nach 5 min und eine 68%ige Fibrin- α -Vernetzung nach 2 h. Das Endprodukt wurde in Endbehälter abgefüllt und zur Lagerung bei -20°C tiefgefroren.

Nach einer abgewandelten Verfahrensweise ist es auch möglich, den Plasminogen-Aktivatoren-Inhibitor bzw. den Plasmin-Inhibitor in einem späteren Stadium zuzufügen, wie durch das folgende Beispiel 2 erläutert wird:

112,5 l humanes, bei -20°C tiefgefrorenes Frischplasma wurde auf +2°C erwärmt. Das entstandene
5 Kryopräzipitat wurde durch Zentrifugieren abgetrennt und bei +2°C mit 10 l einer Pufferlösung, enthaltend 6,6 g $\text{Na}_3\text{-Citrat}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3,4 g NaCl, 10,0 g Glycin, 13,0 g $\text{Glucose}\cdot \text{H}_2\text{O}/\text{l}$, und einem p_H -Wert von 6,5, gewaschen und nochmals bei +2°C zentrifugiert. Der abgetrennte Niederschlag wurde durch Erwärmen auf 37°C verflüssigt. Die so erhaltene Lösung wurde mit 50 KIE Aprotinin/ml versetzt.

In dem so erhaltenen Produkt wurde das Verhältnis Fibrinogen zu kälteunlöslichem Globulin zu
10 Albumin mit 91,0 : 5,3 : 1,1 bestimmt. Diese Bestimmung wurde ebenfalls nach der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Methode, u.zw. a) mit einer nicht reduzierten und b) mit einer mit β -Mercaptoäthanol reduzierten Probe des Gewebeklebers durchgeführt. An Faktor XIII wurden 15,7 Einheiten/ml gefunden bzw. betrug das Verhältnis des Faktors XIII zu Fibrinogen, ausgedrückt in Einheiten des Faktors XIII pro Gramm Fibrinogen, 170. Fibrinogen war in einer Menge von 92,1 mg/ml enthalten.

15 Die Bestimmungen erfolgten in folgender Weise: Die Bestimmung der Faktor XIII-Einheiten erfolgte mittels eines Vernetzungstests, bei dem Faktor XIII-freies Fibrinogen als Substrat verwendet und die durch die Zugabe der unbekannten verdünnten Probe bewirkte Fibrinvernetzung als Maß für die darin enthaltene Menge an Faktor XIII diente. Eine entsprechende Eichkurve wurde mit gepooltem humanem Citratplasma erhalten, wobei per definitionem 1 ml Plasma 1 Einheit Faktor XIII enthält. Die Proteinbe-
20 stimmungen erfolgten mittels der Methode nach Kjeldahl.

Der Vernetzungstest nach der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Methode ergab eine vollständige Fibrin- γ -Vernetzung nach 5 min und eine 87%ige Fibrin- α -Vernetzung nach 2 h. Das Endprodukt wurde in Einweg-Injektionsspritzen abgefüllt und zur Lagerung bei -20°C tiefgefroren.

25

P A T E N T A N S P R Ü C H E :

1. Verfahren zur Herstellung eines Gewebeklebstoffes auf Basis von menschlichen oder tierischen Proteinen, mit einem Gehalt an Fibrinogen und Faktor XIII, d a d u r c h g e k e n n z e i c h -
30 n e t , daß in einer fibrinogenhaltigen Blutplasmafraktion ein Konzentrationsverhältnis von Faktor XIII zu Fibrinogen, ausgedrückt in Einheiten des Faktors XIII pro Gramm Fibrinogen, von mindestens 80 eingestellt und der Blutplasmafraktion ein Plasminogen-Aktivator-Inhibitor oder Plasmin-Inhibitor, vorzugsweise Aprotinin, in einer Menge von 20 bis 2000 KIE/ml sowie gegebenenfalls kälteunlösliches Globulin und/oder Albumin zugefügt werden.

35 2. Verfahren nach Anspruch 1, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß aus einem fibrinogenhaltigen Plasma-Kryopräzipitat durch ein- oder mehrfache Behandlung mit einer Pufferlösung, welche Natriumzitrat, Natriumchlorid, einen Plasminogen-Aktivator-Inhibitor oder Plasmin-Inhibitor sowie gegebenenfalls Glycin und Glucose enthält, kälteunlösliches Plasmaprotein entfernt, der gereinigte Niederschlag gelöst wird und daß gegebenenfalls der gelöste, gereinigte Niederschlag durch Tiefrieren
40 haltbar gemacht wird.